

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg -Universität Mainz

**UNTERSUCHUNG ZUR BETEILIGUNG VON
GABA- UND BENZODIAZEPINREZEPTOREN AM
WIRKUNGSMECHANISMUS VERSCHIEDENER,
DAS ZENTRALNERVENSYSTEM ERREGENDER
ODER DÄMPFENDER PHARMAKA**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg -Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von
ADAM ANTONIADIS
aus Pentalofos, Griechenland

Mainz 1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung zur Beteiligung von
GABA- und Benzodiazepinrezeptoren am Wirkungsmechanismus
verschiedener, das Zentralnervensystem erregender
oder dämpfender Pharmaka

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von
Adam Antoniadis
aus Pentalofos Griechenland



Dekan: Prof. Dr. med. K.-H. Bäßler
1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. W.E. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. med. G.F. Kahl

Tag der mündlichen Prüfung:

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Wollert[†] und Herrn Priv.-Doz. Dr. W.E. Müller für die Vergabe des Themas und die intensive Betreuung bei der Bearbeitung der Problematik.

Die Untersuchungen wurden mit Sachmitteln durchgeführt, die die Deutsche Forschungsgemeinschaft Herrn Prof. Dr. U. Wollert und Herrn Priv.-Doz. Dr. W.E. Müller zur Verfügung stellte.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1.	Tiermaterial	3
2.2.	Substanzen	3
2.3.	Lösungen	4
2.4.	Herstellung des Membranhomogenates aus Rattenhirnen	5
2.5.	Methoden zur Charakterisierung des Benzodiazepin- rezeptors	5
2.5.1.	Allgemeine experimentelle Versuchsbedingungen	5
2.5.2.	Versuchsbedingungen für Sättigungsexperimente mit [³ H]Flunitrazepam	6
2.5.3.	Versuchsbedingungen für Verdrängungsexperimente am Benzodiazepinrezeptor	6
2.6.	Versuchsbedingungen für Verdrängungsexperimente am GABA-Rezeptor	7
2.7.	Versuchsbedingungen für Verdrängungsexperimente am muscarinischen Acetylcholinrezeptor	9
2.8.	Statistische Auswertung	9
3.	Ergebnisse	10
3.1.	Allgemeine Charakterisierung des Benzodiazepin- rezeptors	10
3.1.1.	Bestimmung der Bindungseigenschaften des Benzodia- zepinrezeptors für [³ H]Flunitrazepam	10
3.1.2.	Bestimmung der Affinitäten verschiedener Benzodia- zepine zum Benzodiazepinrezeptor	12
3.1.3.	Bestimmung der Affinitäten verschiedener zentral- wirksamer Pharmaka zum Benzodiazepin- und GABA- Rezeptor	15
3.1.4.	Bestimmung der Affinitäten verschiedener Penicillin- derivate zum Benzodiazepin-, GABA- und muscarinischen Acetylcholinrezeptor	23
3.2.	Beteiligung von Benzodiazepinrezeptorinteraktionen an der Neurotoxizität verschiedener Penicillinderivate	31

4.	Diskussion	35
5.	Zusammenfassung	41
6.	Literatur	42
7.	Lebenslauf	46

1. EINLEITUNG

Pharmaka aus der Gruppe der 1,4-Benzodiazepine sind heute nicht nur mit Abstand die am meisten verwendeten Psychopharmaka, sondern gehören zu den am häufigsten benutzten Arzneimitteln überhaupt. Unter den 1,4-Benzodiazepinen versteht man eine chemisch und vor allem pharmakologisch einheitliche Gruppe von Substanzen, die sich von den beiden Typverbindungen, dem Chlordiazepoxid und dem Diazepam, ableiten. Alle diese Substanzen weisen ein typisches und breites Wirkungsspektrum auf, wobei man im wesentlichen 4 voneinander unabhängige Einzelkomponenten unterscheiden muß:

1. Alle Benzodiazepine haben sedative, hypnotische, aber in hohen Dosierungen keine direkten narkotische Eigenschaften. Aufgrund dieser Wirkungskomponenten werden sie bei nervösen Unruhezuständen zur Sedation und bei Schlafstörungen eingesetzt.
2. Hier sind die krampflösenden, antikonvulsiven Eigenschaften der Benzodiazepine zu nennen, die die Grundlage ihres therapeutischen Einsatzes als Antiepileptika (Status epilepticus) oder bei der Behandlung anderer zentraler Übererregungszustände (Alkohol- und Drogenentzugssymptome, Krämpfe) sind.
3. Eine über zentrale Mechanismen vermittelte Senkung des Tonus der quergestreiften Muskulatur durch Benzodiazepine ist die Grundlage ihres therapeutischen Einsatzes als Muskelrelaxantien bei Muskelspasmen verschiedener Genese. In diesem Zusammenhang ist auch ihr Einsatz bei der Tetanustherapie und in der Narkoseprämedikation zu erwähnen.
4. Als weitere Eigenschaft der Benzodiazepine sind ihre angst- und spannungslösenden ("minor tranquillizer") Wirkungen zu nennen, die sich bei Angstneurosen oder Angstzuständen bei psychosomatischen Erkrankungen günstig auswirken können.

Bisher ist keine andere Substanzgruppe neben den Benzodiazepinen bekannt, die ein entsprechendes pharmakologisches Wirkungsspektrum aufweist. Aufgrund ihrer Eigenschaften kann man annehmen, daß die Benzodiazepine einen sehr selektiven Wirkungsmechanismus besitzen müssen, der aber bis vor kurzem noch weitgehend unbekannt war. Erst in den letzten Jahren ist die Kenntnis der möglichen molekularen Mechanismen einen deutlichen Schritt vorangekommen, und zwar durch den Nachweis spezifischer Bindungsstellen für Benzodiazepine im ZNS, der "Benzodia-

zepinrezeptoren".

Indirekte Hinweise darauf, daß die Benzodiazepine ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren entfalten, lassen sich aus einer Reihe ihrer Eigenschaften ableiten, z.B. aus der ausgeprägten Selektivität ihrer Wirkung, die bisher nur für Benzodiazepine gefunden wurde, aus der starken Wirkung einiger Derivate, deren wirksame Dosis für den Menschen nur wenige Milligramm beträgt, was eine unspezifische Membranwirkung ausschließt, und der Tatsache, daß die Wirkung einiger Benzodiazepinderivate stereospezifisch ist (Möhler und Okada, 1978).

Erste direkte Hinweise auf das Vorkommen spezifischer Rezeptoren für Benzodiazepine fanden die Arbeitsgruppen Braestrup und Squires (1977; 1978a) sowie Möhler und Okada (1977; 1978) mittels direkter Bindungsuntersuchungen mit spezifischen, radioaktiv markierten Liganden ($[^3\text{H}]$ Diazepam, $[^3\text{H}]$ Flunitrazepam). Diese Ergebnisse konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Damm et al., 1978; Möhler et al., 1978; Speth et al., 1978; Costa und Guidotti, 1979).

Man kann daher heute davon ausgehen, daß die Wirkungen der Benzodiazepine im ZNS auf molekularer Ebene über den Benzodiazepinrezeptor vermittelt werden (Braestrup und Nielsen, 1980; Müller, 1980; 1981; Tallman et al., 1980).

Die physiologische Bedeutung dieser Rezeptoren und deren vermuteten endogenen Liganden sind zwar noch nicht eindeutig geklärt, es erscheint aber heute am wahrscheinlichsten, daß der Benzodiazepinrezeptor ein Modulationssystem für die GABAerge Inhibition darstellt (Haefely, 1978).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob für die Wirkungen oder Nebenwirkungen einer Reihe anderer ZNS-aktiver Pharmaka eine Wechselwirkung mit dem Benzodiazepinrezeptor eine Rolle spielt. Da auch Penicilline in sehr hohen Dosierungen zur Auslösung epileptogener Foci führen und als Mechanismus GABA-antagonistische und pentylenetetrazol-ähnliche Wirkungen diskutiert werden (MacDonald und Barker, 1978), wurde auch die mögliche Hemmung der Benzodiazepinrezeptorbindung durch verschiedene Penicillinderivate untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermaterial

Die Untersuchungen erfolgten in Gehirnhomogenaten von männlichen Sprague-Dawley-Ratten. Die Tiere hatten ein Gewicht von 150 - 200 g.

2.2. Substanzen

Amiphenazol	Nicholas, England
Ampicillin (Binotal ^R)	Bayer, Leverkusen
Atropin	Sigma, München
Bemegrid (Eukraton ^R)	Nordmark, Uetersen
Benzylpenicillin (Penicillin G ^R)	Sigma, München
Bicucullin	Sigma, München
Carbamazepin (Tegretal ^R)	Ciba-Geigy, Wehr
Carbenicillin (Mikrocillin ^R)	Sigma, München
Chlordiazepoxid (Librium ^R)	Hoffmann-La Roche, Grenzach
Clonazepam (Rivotril ^R)	Hoffmann-La Roche, Grenzach
Cloxacillin	Beecham, Neuss
Diazepam (Valium ^R)	Hoffmann-La Roche, Grenzach
Dicloxacillin (Dichlorstapenor ^R)	Bayer, Leverkusen
Etamivan	Chemie Linz, Linz, A
Ethosuximid	Desitin-Werk, Hamburg
Etomidat (Hypnomidat ^R)	Jannsen, Düsseldorf
Flucloxacillin	Beecham, Neuss
Fominoben (Noleptan ^R)	Thomae, Biberach
γ -Aminobuttersäure (GABA)	Sigma, München
Glutethimid (Doriden ^R)	Ciba-Geigy, Wehr
Hexobarbital (Evipan-Natrium ^R)	Bayer, Leverkusen
Imidazolessigsäure	Sigma, München
Ketamin (Ketanest ^R)	Gödecke, Berlin
Medazepam (Nobrium ^R)	Hoffmann-La Roche, Grenzach
Methaqualon (Revonal ^R)	Cascan, Wiesbaden
Methsuximid	Desitin-Werk, Hamburg

Methypylon (Noludar ^R)	Hoffmann-La Roche, Grenzach
Nicotamid (Coramin ^R)	Ciba-Geigy, Wehr
Nitrazepam (Mogadan ^R)	Hoffmann-La Roche, Grenzach
Oxacillin (Stapenor ^R)	Bayer, Leverkusen
Pentylentetrazol (Cardiazol ^R)	Sigma, München
Pheneticillin (Phenoxyethylpenicillin ^R)	Merck, Darmstadt
Phenobarbital (Luminal ^R)	Bayer, Leverkusen
Phenytoin (Phenhydan ^R)	Desitin-Werk, Hamburg
Pilocarpin	Sigma, München
Propanidid (Epontal ^R)	Bayer, Leverkusen
Pyrithyldion (Persedon ^R)	Hoffmann-La Roche, Grenzach
Ticarcillin	Beecham, Neuss
Trimethadion	Abbot, Chicago, USA

Radioaktiv markierte Substanzen:

[³ H]γ-Aminobuttersäure; 36,12 Ci/mmol	NEN, Dreieich
[³ H]Flunitrazepam; 87,5 Ci/mmol	NEN, Dreieich
[³ H]Quinuclidinylbenzilat; 29,4 Ci/mmol	NEN, Dreieich

Alle weiteren Substanzen und Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt; Sigma, München oder Fluka, Buchs, CH bezogen und zwar im höchsten Reinheitsgrad.

2.3. Lösungen

Natrium-Phosphat-Puffer (Sörensen):

Lösung A:	NaH ₂ PO ₄	0,066 M
Lösung B:	Na ₂ HPO ₄	0,066 M

Die Lösungen A und B wurden jeweils im Verhältnis 1 : 5 gemischt und der pH-Wert durch Zugabe von Lösung A oder B auf pH 7,4 eingestellt.

Tris-Citrat-Puffer:

Citronensäure	C ₆ H ₈ O ₇	0,1 M
Tris-Base	C ₄ H ₁₁ NO ₃	0,1 M

Die beiden Komponenten wurden im Verhältnis 1 : 3 gemischt und mit Citronensäure auf pH 7,1 eingestellt.

Die pH-Einstellung erfolgte mit einer Einstabmeßkette mit einer Genauigkeit von $\pm 0,02$. Das Gerät wurde täglich geeicht.

2.4. Herstellung des Membrangesamthomogenates aus Rattenhirnen

Die Präparation der Rattenhirne erfolgte nach der Methode von Enna und Snyder (1975). Nach dem Dekapitieren der Ratten wurde das Gehirn freipräpariert, ohne Medulla oblongata und Pons entnommen und in 20 ml eiskaltem demineralisiertem Wasser in einem Glashomogenisator mit Teflonpistill (Potter-Elvehjem) homogenisiert. Dieses Rohhomogenat wurde auf 45 ml verdünnt und 10 min bei 48.000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 100 ml eiskaltem Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,4 resuspendiert (Ultra-Turrax nach Willems, 20.000 rpm, 20 s). Dieses Membrangesamthomogenat fand für alle Experimente Verwendung.

2.5. Methoden zur Charakterisierung des Benzodiazepinrezeptors

2.5.1. Allgemeine experimentelle Versuchsbedingungen

Das Membrangesamthomogenat für Bindungsuntersuchungen am Benzodiazepinrezeptor hatte eine Proteinkonzentration von ca. 1 mg Protein/ml. Das Inkubationsmedium enthielt neben jeweils 1 ml des Membrangesamthomogenates 20 μ l tritiummarkiertes Flunitrazepam in einer Endkonzentration von 0,13 nM. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 4 °C. Die Bestimmung des unspezifisch gebundenen Anteils an der Flunitrazepamgesamtbindung erfolgte in Gegenwart von 10 μ M Diazepam. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert, die Überstände aspiriert und die Sedimente einmal mit 3 ml eiskaltem Natrium-Phosphat-Puffer gewaschen. Die Sedimente wurden in je 0,75 ml Gewebssauflöser (TS 1; Zinsser) im Wasserbad bei 37 °C ca. 1 h inku-

biert. Danach waren die Sedimente aufgelöst, und die Proben wurden in Szintillationsgefäße (Zinsser-Polyvial 714) überführt. Nach Zugabe von 9 ml Szintillator für nichtwässrige Proben (Quickszint 501; Zinsser) wurden die Szintillationsgefäße gut geschüttelt. Die Unterdrückung der Chemolumineszenz erfolgte durch Zugabe von 0,1 ml Essigsäure (96 %). Die Radioaktivitätsmessung wurde in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Packard, TRI-CARB Modell 3255) durchgeführt. Die Zählausbeute betrug für alle tritiummarkierten Substanzen 39,4 % und wurde mittels eines Toluolstandards bestimmt. Auf eine Quenchkorrektur konnte bei allen Versuchen verzichtet werden, da die Abweichungen des Quenchkorrekturfaktors unter 5 % lagen und zur Auswertung der Ergebnisse nur die relativen Radioaktivitätsmengen benötigt wurden. Für alle Untersuchungen wurden 4 - 6 unabhängige Einzelexperimente durchgeführt. Die zur Auswertung verwendeten Werte waren Mittelwerte von Dreifachbestimmungen. Die Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951).

2.5.2. Versuchsbedingungen für Sättigungsexperimente mit [^3H]Flunitrazepam

Die Sättigungsexperimente wurden mit steigenden Konzentrationen (0,25 - 10,7 nM) des radioaktiv markierten Liganden Flunitrazepam durchgeführt. Der spezifisch gebundene Anteil des Flunitrazepam konnte durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung bestimmt werden. Die Ermittlung der apparenten Dissoziationskonstanten K_D und der maximalen Anzahl der Bindungsstellen $B_{\max}$ erfolgte durch graphische Darstellung der Ergebnisse nach der Beziehung von Scatchard (1949).

2.5.3. Versuchsbedingungen für Verdrängungsexperimente am Benzodiazepinrezeptor

Das unter 2.5.1. beschriebene Inkubationsmedium enthielt bei Verdrängungsexperimenten steigende Konzentrationen der jeweiligen verdrängen-

den Substanz. Als Maß für die Affinität der verdrängenden Substanz zum Rezeptor diente die halbmaximale Hemmkonzentration dieser Substanz, ausgedrückt als IC_{50} -Wert ("inhibitory concentration 50 %"). Dieser Wert gibt demnach die Konzentration der jeweiligen verdrängenden Substanz an, die in der Lage ist 50 % des spezifisch gebundenen radioaktiv markierten Liganden aus der Rezeptorbindung zu verdrängen. Die Ermittlung des IC_{50} -Wertes erfolgte graphisch im doppelt-logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz. Auf der Abszisse wurden die Zehnerlogarithmen der Konzentrationen der verdrängenden Substanzen aufgetragen und auf der Ordinate $1 = \ln \%(100 - \%)$, wobei der Prozentwert die Verdrängung des spezifisch gebundenen Liganden darstellt.

2.6. Versuchsbedingungen für Verdrängungsexperimente am GABA-Rezeptor

Die Bestimmung der spezifischen [3H]GABA-Bindung erfolgte nach der Methode von Enna und Snyder (1977).

Die Herstellung des Membrangesamthomogenates ist unter 2.4. beschrieben. Dieses Homogenat wurde mit 0,05 % Triton X-100 30 min bei 37 °C vorinkubiert und dann 20 min bei 48.000 x g abzentrifugiert. Die Resuspendierung des resultierenden Sedimentes erfolgte in 0,1 M Tris-Citrat-Puffer pH 7,1. Aliquote von je 1 ml dieses Gewebekomogenates (ca. 0,5 mg Protein/ml) wurden zusammen mit 5,73 nM [3H]GABA und steigenden Konzentrationen der entsprechenden verdrängenden Substanzen 10 min bei 4 °C inkubiert. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte in Anwesenheit von 1 μ M unmarkierter GABA. Die weitere Aufarbeitung der Proben wurde gemäß 2.5.1. durchgeführt. Unter diesen Bedingungen hatte die spezifische [3H]GABA-Bindung alle charakteristischen Eigenschaften der Natrium-unabhängigen [3H]GABA-Bindung wie durch die Verdrängungsexperimente mit GABA, Imidazolessigsäure und Bicucullin gezeigt werden konnte (Abb. 1; Enna und Snyder, 1977; Horng und Wong, 1979).

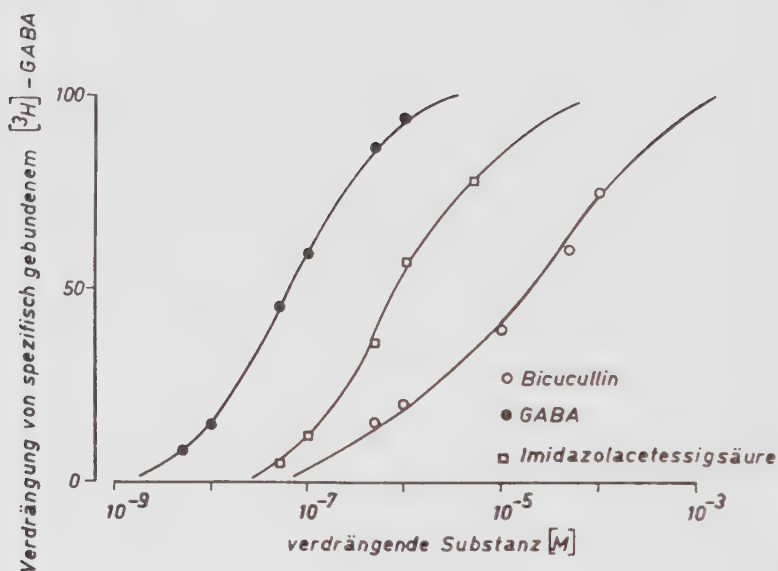


Abb. 1: Verdrängung spezifisch gebundener $[^3\text{H}]$ GABA im Rattenhirn durch GABA (IC_{50} : 0,000058 mM), Bicucullin (IC_{50} : 0,0091 mM) und Imidazolesigsäure (IC_{50} : 0,00055 mM). Die Punkte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen eines charakteristischen Einzelexperimentes.

2.7. Versuchsbedingungen für Verdrängungsexperimente am muscarinischen Acetylcholinrezeptor

Die Untersuchungen am muscarinischen Acetylcholinrezeptor erfolgten nach der Methode von Yamamura und Snyder (1974) in Rattenhirnhomogenaten, die gemäß 2.4. hergestellt wurden.

Aliquote (1 ml), des in 100 ml eiskaltem Natrium-Phosphat-Puffer resuspendierten Sedimentes (ca. 1 mg Protein/ml) wurden zusammen mit 0,39 nM [3 H]QNB und steigenden Konzentrationen der jeweiligen verdrängenden Substanzen 60 min bei 22 °C inkubiert. Die Bestimmung des unspezifischen Anteils der Bindung an der Gesamtmenge gebundener Radioaktivität erfolgte in Gegenwart von 1 μ M Atropin. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert und gemäß 2.5.1. aufgearbeitet.

2.8. Statistische Auswertung

Die angegebenen Streuungsangaben stellen den mittleren Fehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) dar. Dem statistischen Vergleich von Mittelwerten diente der gepaarte zweiseitige t-Test nach Student. Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Allgemeine Charakterisierung des Benzodiazepinrezeptors

3.1.1. Bestimmung der Bindungseigenschaften des Benzodiazepinrezeptors für [^3H]Flunitrazepam

Die in Abb. 2 dargestellten Ergebnisse von Sättigungsexperimenten am Benzodiazepinrezeptor zeigen eine sättigbare spezifische Bindung. Die unspezifische Bindung ist der eingesetzten Ligandenkonzentration (0,25 - 10,7 nM) direkt proportional. Die graphische Darstellung der Ergebnisse nach Scatchard (1949) ergibt eine Gerade (Abb. 2), was auf nur eine Population von Bindungsstellen für [^3H]Flunitrazepam hinweist. Durch Extrapolation der Geraden auf die Abszisse ergibt sich für den Benzodiazepinrezeptor eine maximale Anzahl von Bindungsstellen B_{max} 1,70 pmol/mg Protein. Die als Quotient aus Abszissen- und Ordinatenabschnitt errechnete apparente Dissoziationskonstante K_D betrug 3,33 nM. Borbe et al. (1980) erhielten für das Rattenhirn und die Rinderretina mit der gleichen Zentrifugationsmethode ähnliche Werte.

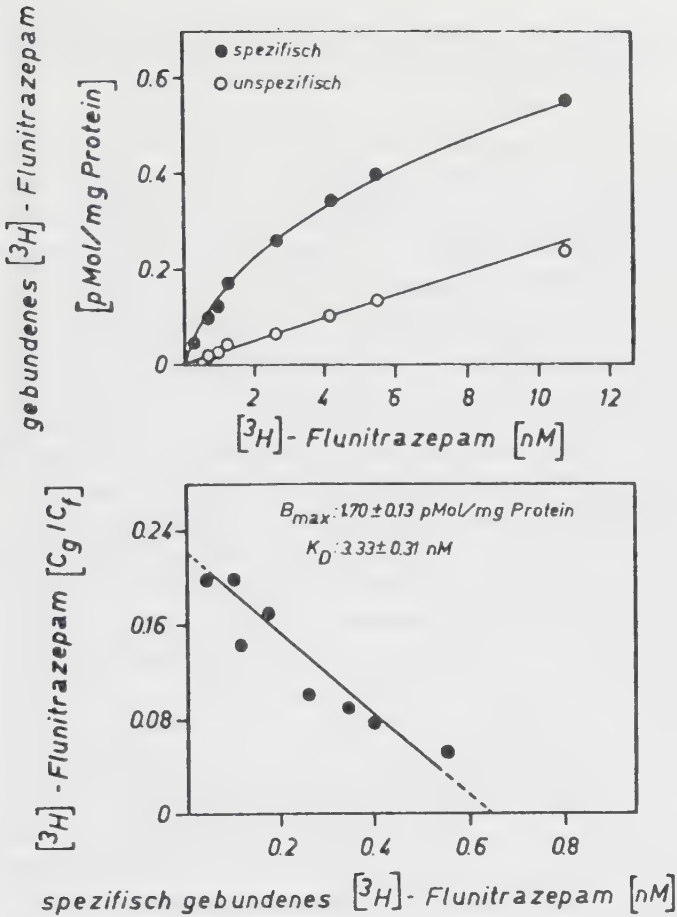


Abb. 2: Bestimmung von Rezeptoreigenschaften im Gesamthomogenat des Rattenhirns durch direkte Bindungsversuche mit $[^3\text{H}]$ Flunitrazepam. Dargestellt ist ein charakteristisches Einzelexperiment.

Oberer Teil: spezifische und unspezifische $[^3\text{H}]$ Flunitrazepambindung als Funktion der eingesetzten Flunitrazepamkonzentration.

Unterer Teil: graphische Darstellung der Ergebnisse nach Scatchard (1949). Auf der Abszisse sind die molaren Konzentrationen des spezifisch gebundenen Liganden ($[^3\text{H}]$ Flunitrazepam), auf der Ordinate der Quotient aus gebundenem (c_g) und freiem (c_f) Anteil aufgetragen. Die angegebenen Werte für B_{max} und K_D sind Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus 4 unabhängigen Experimenten.

3.1.2. Bestimmung der Affinitäten verschiedener Benzodiazepine zum Benzodiazepinrezeptor

Viele Benzodiazepine können in niedrigen Konzentrationen [^3H]Flunitrazepam aus seiner spezifischen Rezeptorbindung verdrängen. Mit Hilfe solcher Rezeptorbindungsexperimente gelang es verschiedenen Autoren (Braestrup und Squires, 1977; Möhler und Okada, 1977; Damm et al., 1978), die Liganden-Bindung am Benzodiazepinrezeptor zu charakterisieren, die Affinitäten der jeweiligen verdrängenden Substanzen zum Rezeptor zu bestimmen und mit ihrer pharmakologischen Wirksamkeit zu vergleichen. Zur Charakterisierung der Substratspezifität des Rezeptors wurden daher, wie unter 2.5.2. beschrieben, Verdrängungsexperimente mit 5 Benzodiazepinderivaten durchgeführt. Die Verdrängungskurven der 5 untersuchten Derivate sind in Abb. 3 zusammengestellt. Aus den Verdrängungskurven ist ersichtlich, daß Clonazepam mit einem IC_{50} -Wert von 1,6 nM die höchste Affinität zum Rezeptor aufweist. Nitrazepam und Diazepam zeigen eine etwas geringere Affinität. Die Verdrängungskurven von Chlordiazepoxid und Medazepam verlaufen im Vergleich dazu etwas flacher und sind zu höheren Konzentrationen hin verschoben.

Aus den Einzelwerten der Verdrängungskurven wurden durch Auftragung der Werte im doppeltlogarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz die IC_{50} -Werte für die jeweilige verdrängende Substanz ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 mit den entsprechenden Literaturdaten (Borbe et al., 1980) verglichen.

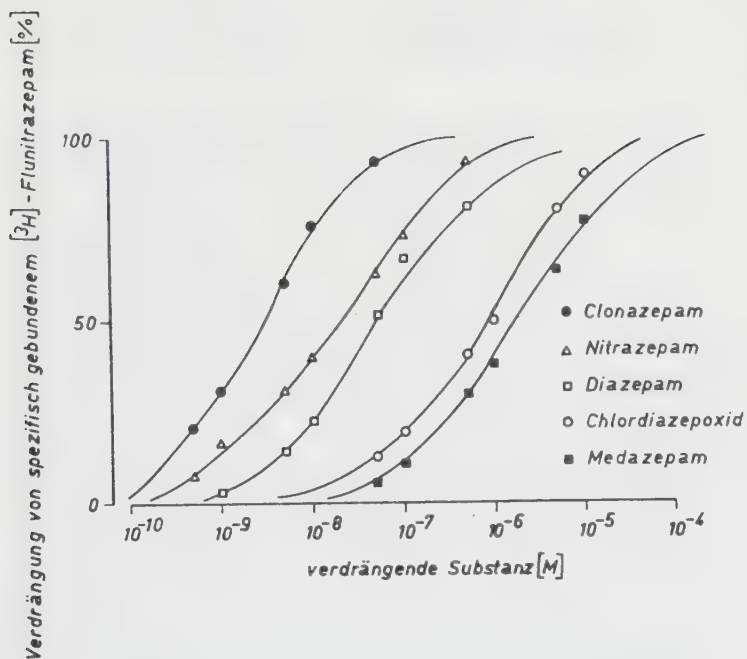


Abb. 3: Verdrängung von spezifisch gebundenem $[^3\text{H}]$ Flunitrazepam im Rattenhirn durch verschiedene Benzodiazepine. Die Punkte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen eines charakteristischen Einzelexperimentes.

Tab. 1: Hemmung spezifischer [^3H]Flunitrazepambindung durch verschiedene Benzodiazepine

Verdränger	IC ₅₀ [μM]	
	Rattenhirn	Literaturwerte*
Clonazepam	0,0016 $\pm$ 0,0002	0,002 $\pm$ 0,0006
Nitrazepam	0,015 $\pm$ 0,001	0,031 $\pm$ 0,005
Diazepam	0,033 $\pm$ 0,005	0,019 $\pm$ 0,002
Chlordiazepoxid	0,5 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,4
Medazepam	2,4 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 0,4

* Borbe et al. (1980)

Angegeben sind IC₅₀-Werte (50 % Verdrängung des spezifisch gebundenen Liganden durch die jeweilige Substanz), die im doppelt-logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz ermittelt wurden und Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus 4 - 6 unabhängigen Experimenten darstellen.

3.1.3. Bestimmung der Affinitäten verschiedener zentralwirksamer Pharmaka zum Benzodiazepin- und GABA-Rezeptor

In Verdrängungsuntersuchungen zeigten Braestrup und Squires (1978b), daß eine große Zahl verschiedener zentral wirksamer Pharmaka nahezu ohne Affinität zum Benzodiazepinrezeptor ist. Müller et al. (1978) beschreiben jedoch für das Hypnotikum Methaqualon und das Analeptikum Pentylentetrazol Affinitäten zum Benzodiazepinrezeptor, die die Entfaltung ihrer pharmakologischen Wirkung über diesen Rezeptor als möglich erscheinen lassen. Aufgrund ähnlicher pharmakologischer Eigenschaften wurden verschiedene andere ZNS-stimulierende oder -dämpfende Pharmaka auf mögliche Interaktionen mit dem Benzodiazepinrezeptor untersucht.

Bei den verwendeten Konzentrationen bewirken die meisten der untersuchten Pharmaka eine Verdrängung des spezifisch gebundenen [^3H]Flunitrazepam vom Rezeptor. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Die intravenösen Anästhetika Etomidat und Ketamin verdrängen 50 % des spezifisch gebundenen [^3H]Flunitrazepam bei 1 mM. Propandid zeigt eine niedrigere Verdrängungsaktivität, während Hexobarbital bei dieser Konzentration fast keine Affinität zum Benzodiazepinrezeptor aufweist. Bei den Hypnotika erwies sich Glutethimid mit 95 % Verdrängung bei 1 mM als stärkster Inhibitor der [^3H]Flunitrazepambindung, gefolgt von Methaqualon mit 77 %. Die anderen Hypnotika, Pyrrithyldion, Methypylon und Phenobarbital, zeigten nur eine geringe prozentuale Verdrängung des spezifisch gebundenen Liganden. Von den untersuchten Antikonvulsiva waren Phenytoin, Carbamazepin und Methsuximid mit 50 % Verdrängung die am stärksten inhibierenden Substanzen, während Trimethadion und Ethosuximid auch bei zehnmal höheren Konzentrationen nur ca. 30 % Verdrängung zeigten.

Von den ZNS-stimulierenden Pharmaka weist das Antitussivum Fominoben mit 97 % Verdrängung bei 0,1 mM (IC_{50} : ca. 1 μM) eine vergleichsweise hohe Affinität zum Benzodiazepinrezeptor auf. Von den übrigen untersuchten Analeptika erwiesen sich nur Pentylentetrazol (47 % Verdrängung bei 1 mM) und Amiphenazol (45 % Verdrängung bei 1 mM) in Bezug auf die Verdrängung des spezifisch gebundenen [^3H]Flunitrazepam wirksam. Ob dieser Befund einen Hinweis auf antagonistische Aktivität am Benzodiazepinrezeptor für diese beiden Analeptika darstellt, wie es für Pentylentetrazol vermutet wird (Müller et al., 1978; Marangos et

al., 1979) ist noch unklar. Die Verdrängung des spezifisch gebundenen [^3H]Flunitrazepam durch die am stärksten wirksamen Pharmaka Methaqualon, Glutethimid und Fominoben ist eindeutig konzentrationsabhängig, wie die Verdrängungskurven in Abb. 4 zeigen. Die aus den Verdrängungskurven ermittelten Hillkoeffizienten wichen nicht von 1 ab, geben somit keine Hinweise auf eine positive oder negative Kooperativität. Die IC_{50} -Werte dieser Pharmaka sowie des Pentylenetetrazol sind in Tab. 3. zusammengestellt.

Da Glutethimid auch atropinähnliche Eigenschaften zeigt (Hemmung von Speichelsekretion und Darmmotilität - Goodman und Gilman, 1980), wurde seine Affinität zum muscarinischen Acetylcholinrezeptor untersucht. Die Konzentration des Glutethimid, die benötigt wurde, um 50 % des spezifisch gebundenen [^3H]QNB zu verdrängen, lag bei ca. 180 μM (Abb. 5) und somit deutlich höher als die entsprechende Konzentration, die für gleiche Verdrängung (50 %) des spezifisch gebundenen [^3H]Flunitrazepam gefunden wurde (Tab. 3).

Um zu testen, ob die am Benzodiazepinrezeptor bindenden zentralwirksamen Pharmaka auch am GABA-Rezeptor eine ähnliche Affinität aufweisen, wurde nach der unter 2.6. beschriebenen Methode die Verdrängungsaktivität dieser Pharmaka am GABA-Rezeptor untersucht. Die Ergebnisse der Verdrängungsexperimente sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Beim Keta-min und Amiphenazol wurde am GABA-Rezeptor eine ähnliche inhibitorische Aktivität beobachtet wie am Benzodiazepinrezeptor, während Pentylenetetrazol am GABA-Rezeptor eine deutlich geringere Inhibition zeigt als am Benzodiazepinrezeptor. Die relativ hohen Affinitäten von Fominoben, Glutethimid und Methaqualon zum Benzodiazepinrezeptor zeigen eine gewisse Spezifität, denn alle 3 Pharmaka besitzen fast keine Verdrängungsaktivität am GABA-Rezeptor.

Tab. 2: Inhibition spezifischer [^3H]Flunitrazepambindung durch verschiedene ZNS-dämpfende und ZNS-stimulierende Pharmaka

Verdränger	% Hemmung spezifischer [^3H]Flunitrazepambindung		
	10 mM	1 mM	0,1 mM
<u>Narkotika</u>			
Etomidat	n.b.	58,2 $\pm$ 3,5	-
Ketamin	91,5 $\pm$ 0,9	55,1 $\pm$ 1,6	12,3 $\pm$ 0,7
Propanidid	51,6 $\pm$ 2,8	32,8 $\pm$ 3,4	-
Hexobarbital	26,6 $\pm$ 2,1	14,9 $\pm$ 1,6	-
<u>Hypnotika</u>			
Glutethimid	93,0 $\pm$ 1,2	94,6 $\pm$ 0,7	64,9 $\pm$ 0,6
Methaqualon	n.b.	76,6 $\pm$ 1,1	33,2 $\pm$ 0,8
Pyrrithyldion	84,4 $\pm$ 2,1	27,6 $\pm$ 2,7	11,0 $\pm$ 1,4
Methypylon	71,8 $\pm$ 1,2	27,4 $\pm$ 2,8	-
Phenobarbital	56,1 $\pm$ 0,7	19,7 $\pm$ 0,7	-
<u>Antikonvulsiva</u>			
Phenytoin	n.b.	54,0 $\pm$ 0,3	33,0 $\pm$ 3,6
Carbamazepin	n.b.	45,4 $\pm$ 1,8	26,0 $\pm$ 3,0
Methsuximid	58,0 $\pm$ 4,0	38,4 $\pm$ 4,6	18,2 $\pm$ 1,4
Trimethadion	28,9 $\pm$ 1,5	-	-
Ethosuximid	31,1 $\pm$ 0,9	-	-
<u>Analeptika</u>			
Fominoben	n.b.	n.b.	97,3 $\pm$ 0,5
Amiphenazol	91,8 $\pm$ 1,4	45,3 $\pm$ 1,4	19,5 $\pm$ 1,6
Pentylentetrazol	82,6 $\pm$ 2,6	46,6 $\pm$ 2,9	20,1 $\pm$ 2,3
Etamivan	73,8 $\pm$ 0,8	31,1 $\pm$ 2,2	11,0 $\pm$ 2,4
Nicethamid	65,6 $\pm$ 1,6	18,5 $\pm$ 2,1	-
Bemegrid	60,8 $\pm$ 1,2	13,5 $\pm$ 1,3	-

Legende zu Tab. 2 umseitig.

Legende zu Tab. 2:

Spezifische [^3H] Flunitrazepambindung im Rattenhirnhomogenat in Anwesenheit verschiedener ZNS-dämpfender und ZNS-stimulierender Pharmaka. Die Werte sind als Prozent Verdrängung der spezifischen [^3H] Flunitrazepambindung angegeben. Alle Experimente wurden als Dreifachbestimmungen mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) durchgeführt. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus 4 - 6 unabhängigen Experimenten dar.

n.b. = nicht bestimmt

- = Verdrängung < 10 %

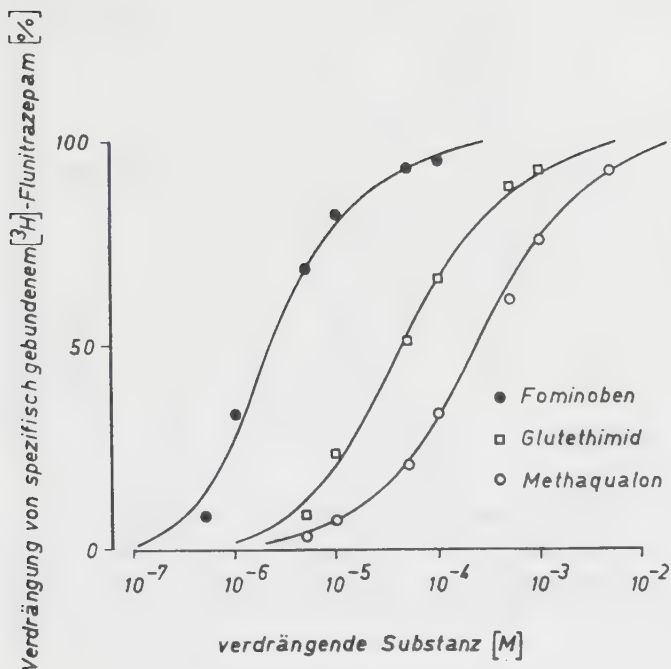


Abb. 4: Verdrängung von spezifisch gebundenem [³H]Flunitrazepam durch das Analeptikum Fominoben und die Hypnotika Glutethimid und Methaqualon. Die Punkte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen eines charakteristischen Einzelexperimentes dar.

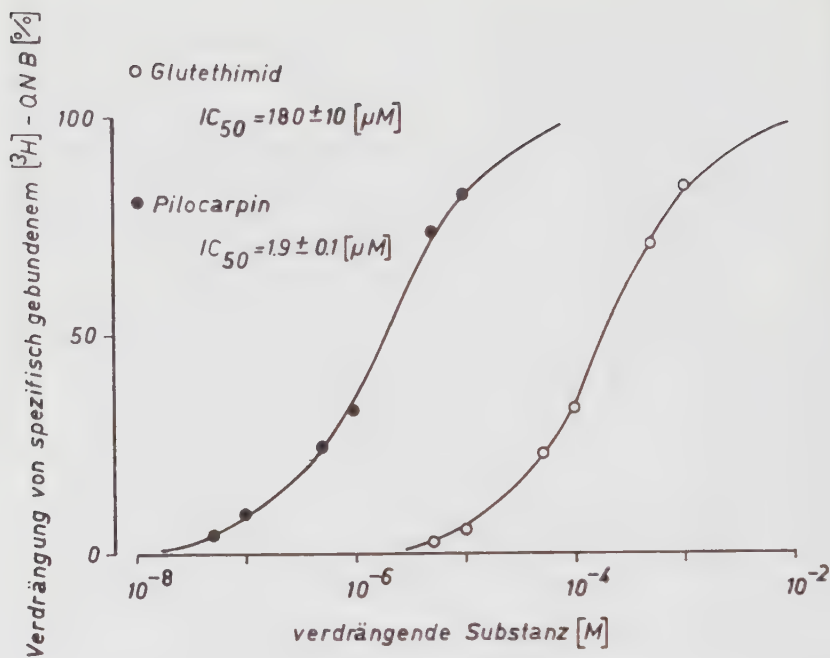


Abb. 5: Verdrängung von spezifisch gebundenem $[^3H]$ -QNB im Rattenhirn durch Pilocarpin und Glutethimid. Die Punkte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen eines charakteristischen Einzelexperimentes.

Tab. 3: Hemmung spezifischer [^3H]Flunitrazepambindung durch einige Hypnotika und Analeptika

Verdränger	IC ₅₀ -Werte [μM]
Fominoben	1,5 $\pm$ 0,1
Glutethimid	42,0 $\pm$ 2,0
Methaqualon	220,0 $\pm$ 10,0
Pentylentetrazol	1.000,0 $\pm$ 100

Angegeben sind IC₅₀-Werte (50 % Verdrängung des spezifisch gebundenen Liganden durch die jeweilige Substanz), die im doppelt-logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz ermittelt wurden und Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus 4 - 6 unabhängigen Experimenten darstellen.

Tab. 4: Inhibition spezifischer [^3H]GABA-Bindung durch verschiedene ZNS-dämpfende oder ZNS-stimulierende Pharmaka

Verdränger	% Hemmung spezifischer [^3H]GABA-Bindung		
	10 mM	1 mM	0,1 mM
Ketamin	62,6 $\pm$ 4,9	38,3 $\pm$ 1,3	24,5 $\pm$ 4,2
Glutethimid	-	-	-
Methaqualon	-	15,4 $\pm$ 3,5	-
Fominoben	-	-	-
Amiphenazol	70,2 $\pm$ 1,4	32,2 $\pm$ 4,8	16,2 $\pm$ 2,8
Pentylentetrazol	41,6 $\pm$ 5,8	26,1 $\pm$ 6,9	-
Etamivan	28,8 $\pm$ 2,0	-	-
Nicetamid	28,2 $\pm$ 2,4	-	-
Bemegrid	27,0 $\pm$ 2,1	-	-

Spezifische [^3H] GABA-Bindung im Rattenhirnhomogenat in Anwesenheit verschiedener ZNS-dämpfender oder ZNS-stimulierender Pharmaka. Die Werte sind als Prozent Verdrängung der spezifischen [^3H]GABA-Bindung angegeben. Alle Experimente wurden als Dreifachbestimmungen mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) durchgeführt. Die Werte sind Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus 4 - 6 unabhängigen Experimenten.

3.1.4. Bestimmung der Affinitäten verschiedener Penicillinderivate zum Benzodiazepin-, GABA- und muscarinischen Acetylcholinrezeptor

Mehrere Autoren haben in den letzten Jahren darauf hingewiesen, daß Penicilline die synaptische Aktivität des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) reduzieren. Dieser Mechanismus wurde auch für die konvulsiven und epileptogenen Eigenschaften von hochdosierten Penicillinderivaten verantwortlich gemacht (Curtis et al., 1972; Davidoff, 1972). Die Frage, ob die GABA-antagonistische Aktivität direkt am GABA-Rezeptor vermittelt wird, ist jedoch noch umstritten (Curtis et al., 1972).

Um die Affinität verschiedener Penicillinderivate zum GABA-Rezeptor zu bestimmen, wurde deren Fähigkeit als Inhibitoren der spezifischen Ligandenbindung an Rattenhirnmembranen untersucht. Bei 3 unterschiedlichen Konzentrationen (50 mM, 5 mM, 0,5 mM) wurden die Affinitäten der Penicillinderivate zum Benzodiazepin- und GABA-Rezeptor untersucht und anschließend die IC_{50} -Werte ermittelt. Die Interaktion der Penicilline mit beiden Rezeptoren weist auf einen gewissen Grad von Selektivität der Penicilline gegenüber dem GABA-Rezeptor hin, da die Verdrängungsversuche am muscarinischen Acetylcholinrezeptor keine nennenswerte Verdrängung des spezifisch gebundenen [3H] QNB erbrachten. Lediglich Cloxacillin und Flucloxacillin zeigten bei der höchsten Konzentration von 50 mM 50 % Verdrängung des spezifisch gebundenen [3H]QNB (Tab. 5). Penicillinkonzentrationen von 5 mM bzw. 0,5 mM zeigten keine Beeinflussung der spezifischen [3H]QNB-Bindung.

Die Ergebnisse der Verdrängungsuntersuchungen mit verschiedenen Penicillinen am GABA- und Benzodiazepinrezeptor sind in den Tab. 6 und 7 zusammengestellt. Aus diesen Tab. geht hervor, daß alle Penicillinderivate näherungsweise die gleiche Affinität zum GABA- und zum Benzodiazepinrezeptor zeigen. Mit Ausnahme von Pheneticillin, Ticarcillin und Carbenicillin waren alle anderen Derivate auch bei den niedrigen Konzentrationen relativ stark wirksam. Die zur halbmaximalen Verdrängung der Liganden benötigten Konzentrationen der Penicilline lagen im millimolaren Bereich. Die höchste Affinität fand sich für die 3 Cloxacillinderivate (Dicloxacillin, Cloxacillin, Flucloxacillin), während Oxacillin, Pheneticillin, Benzylpenicillin und mit Abstand Ampicillin eine niedrigere Affinität zum GABA-Rezeptor zeigten (Tab.8).

Der für Benzylpenicillin viel niedrigere Wert, von dem Olsen et al. (1978) für die Inhibition der [^3H]GABA-Bindung an Mäusegehirnmembranen berichten, konnte an Rattenhirnmembranen, die mit Triton X-100 vorbehandelt waren, nicht reproduziert werden. Die Affinitäten der Penicillinderivate zum GABA-Rezeptor sind viel niedriger als die Affinität von GABA selbst, bzw. von den GABA-Antagonisten Imidazolessigsäure oder Bicucullin (Tab. 8). Allerdings liegt die Affinität von Pentylenetetrazol zum GABA-Rezeptor in der gleichen Größenordnung wie die von Flucloxacillin und Oxacillin. Andererseits hat Pentylenetetrazol, wie aus Tab. 8 zu entnehmen ist, eine höhere Affinität zum Benzodiazepinrezeptor. Da von verschiedenen Autoren (Wilson und Escueta, 1974; MacDonald und Barker, 1977; 1978) gemeinsame synaptische Mechanismen für Penicilline und Pentylenetetrazol angenommen wurden, wurde die Affinität von Penicillinderivaten zum Benzodiazepinrezeptor untersucht.

Die zur Erreichung einer halbmaximalen Verdrängung des spezifisch gebundenen [^3H]Flunitrazepam erforderlichen Konzentrationen variierten um fast 2 Zehnerpotenzen zwischen den einzelnen untersuchten Penicillinen (Tab. 8). Dicloxacillin und Cloxacillin zeigten mit IC_{50} -Werten von jeweils 5 mM die höchste Affinität, während Oxacillin, Pheneticillin, Ticarcillin und Ampicillin IC_{50} -Werte zwischen 16 und 86 mM aufwiesen. Für Carbenicillin wurde zur halbmaximalen Verdrängung des Liganden eine Konzentration von 330 mM benötigt. In Abb. 6 und 7 sind Verdrängungskurven einiger Penicilline am GABA- bzw. Benzodiazepinrezeptor dargestellt.

Tab. 5: Inhibition spezifischer [^3H]QNB-Bindung durch verschiedene Penicillinderivate

Penicilline	% Hemmung spezifischer [^3H]QNB-Bindung		
	50 mM	5 mM	0,5 mM
Cloxacillin	44,1 $\pm$ 0,7	-	-
Dicloxacillin	-	-	-
Flucloxacillin	55,0 $\pm$ 4,4	-	-
Oxacillin	14,1 $\pm$ 4,0	-	-
Benzylpenicillin	19,1 $\pm$ 1,9	-	-
Ampicillin	-	-	-
Pheneticillin	13,2 $\pm$ 3,1	-	-
Ticarcillin	11,0 $\pm$ 2,1	-	-
Carbenicillin	11,5 $\pm$ 1,9	-	-

Spezifische [^3H]QNB-Bindung im Rattenhirnhomogenat in Anwesenheit verschiedener Penicillinderivate. Die Werte sind als Prozent Verdrängung der spezifischen [^3H]QNB-Bindung angegeben. Alle Experimente wurden als Dreifachbestimmungen mit 3 unterschiedlichen Penicillinkonzentrationen (50 mM, 5 mM, 0,5 mM) durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus 4 - 6 unabhängigen Experimenten.

Tab. 6: Inhibition spezifischer [^3H]GABA-Bindung durch verschiedene Penicillinderivate

Penicilline	% Hemmung spezifischer [^3H]GABA-Bindung		
	50 mM	5 mM	0,5 mM
Cloxacillin	95,3 $\pm$ 2,6	33,6 $\pm$ 2,2	22,8 $\pm$ 4,4
Dicloxacillin	n.b.	58,9 $\pm$ 2,2	32,3 $\pm$ 2,4
Flucloxacillin	99,8 $\pm$ 0,2	47,7 $\pm$ 4,2	30,5 $\pm$ 2,3
Oxacillin	93,5 $\pm$ 1,7	40,2 $\pm$ 2,2	22,3 $\pm$ 4,2
Benzylpenicillin	56,4 $\pm$ 1,9	20,5 $\pm$ 3,4	11,7 $\pm$ 1,7
Ampicillin	42,0 $\pm$ 1,7	16,1 $\pm$ 2,1	13,5 $\pm$ 0,8
Pheneticillin	55,7 $\pm$ 3,0	19,4 $\pm$ 3,5	-
Ticarcillin	41,2 $\pm$ 6,1	17,0 $\pm$ 2,2	-
Carbenicillin	22,8 $\pm$ 1,4	21,2 $\pm$ 4,6	-

Spezifische [^3H]GABA-Bindung im Rattenhirnhomogenat in Anwesenheit verschiedener Penicillinderivate. Die Werte sind als Prozent Verdrängung der spezifischen [^3H]GABA-Bindung angegeben. Alle Experimente wurden als Dreifachbestimmungen mit 3 unterschiedlichen Penicillinkonzentrationen (50 mM, 5 mM, 0,5 mM) durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus 4 - 6 unabhängigen Experimenten.

n.b. = nicht bestimmt

- = Verdrängung < 10 %

Tab. 7: Inhibition spezifischer [^3H]Flunitrazepambindung durch verschiedene Penicillinderivate

Penicilline	% Hemmung spezifischer [^3H]Flunitrazepambindung		
	50 mM	5 mM	0,5 mM
Cloxacillin	95,4 $\pm$ 1,8	62,7 $\pm$ 2,0	17,2 $\pm$ 4,4
Dicloxacillin	n.b.	52,5 $\pm$ 2,1	19,0 $\pm$ 1,1
Flucloxacillin	89,0 $\pm$ 2,7	39,1 $\pm$ 5,6	16,0 $\pm$ 1,6
Oxacillin	77,1 $\pm$ 2,9	41,3 $\pm$ 4,2	14,5 $\pm$ 1,5
Benzylpenicillin	60,4 $\pm$ 2,1	20,1 $\pm$ 1,6	11,7 $\pm$ 1,8
Ampicillin	55,3 $\pm$ 0,7	20,4 $\pm$ 2,1	-
Pheneticillin	47,0 $\pm$ 2,3	16,2 $\pm$ 3,1	-
Ticarcillin	44,5 $\pm$ 2,5	12,1 $\pm$ 1,6	-
Carbenicillin	20,4 $\pm$ 1,8	13,3 $\pm$ 1,0	-

Spezifische [^3H]Flunitrazepambindung im Rattenhirnhomogenat in Anwesenheit verschiedener Penicillinderivate. Die Werte sind als Prozent Verdrängung der spezifisch [^3H]Flunitrazepambindung angegeben. Alle Experimente wurden als Dreifachbestimmungen mit 3 unterschiedlichen Penicillinkonzentrationen (50 mM, 5 mM, 0,5 mM) durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus 4 - 6 unabhängigen Experimenten.

n.b. = nicht bestimmt

- = Verdrängung < 10 %

Tab. 8: Hemmung spezifischer [^3H]Flunitrazepam- und [^3H]GABA-Bindung durch verschiedene Penicillinderivate

Verdränger	IC ₅₀ -Werte [mM]	
	[^3H]GABA	[^3H]Flunitrazepam
GABA	0,000058 ± 0,000006	-
Imidazolessigsäure	0,00055 ± 0,0001	-
Bicucullin	0,0096 ± 0,001	-
Pentylentetrazol	10,0 ± 0,7	1,0 ± 0,1
Dicloxacillin	2,9 ± 0,1	5,0 ± 0,6
Cloxacillin	4,2 ± 0,6	5,3 ± 1,3
Flucloxacillin	6,6 ± 2,1	9,1 ± 1,0
Oxacillin	18,5 ± 2,7	15,8 ± 3,0
Pheneticillin	41,0 ± 4,5	26,0 ± 0,9
Benzylpenicillin	40,0 ± 2,3	41,0 ± 8,0
Ticarcillin	-	41,0 ± 2,4
Carbenicillin	-	330,0 ± 78
Ampicillin	83,0 ± 3,1	86,0 ± 3,8

Angegeben sind IC₅₀-Werte (50 % Verdrängung des spezifisch gebundenen Liganden durch die jeweilige Substanz), die im doppelt-logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz ermittelt wurden und Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus 4 - 6 unabhängigen Experimenten darstellen.

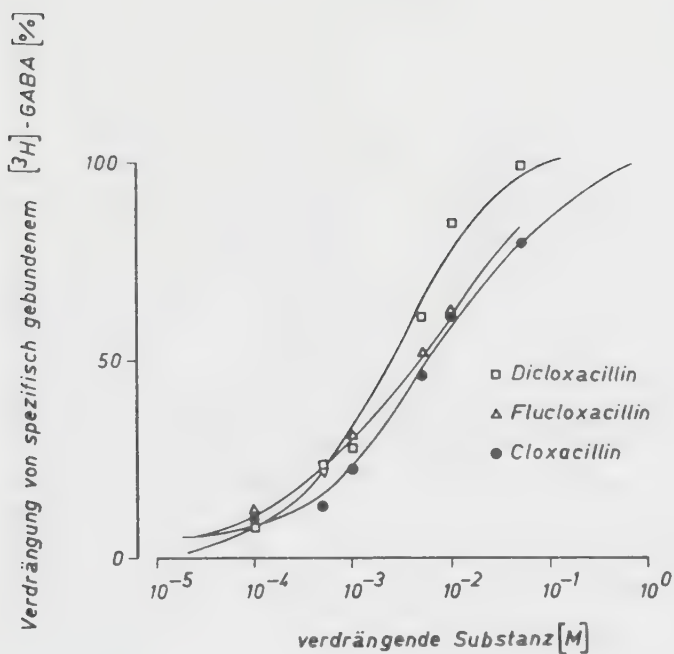


Abb. 6: Verdrängung spezifischer $[^3\text{H}]$ GABA-Bindung durch verschiedene Penicillinderivate. Die Punkte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen eines charakteristischen Einzelexperimentes dar.

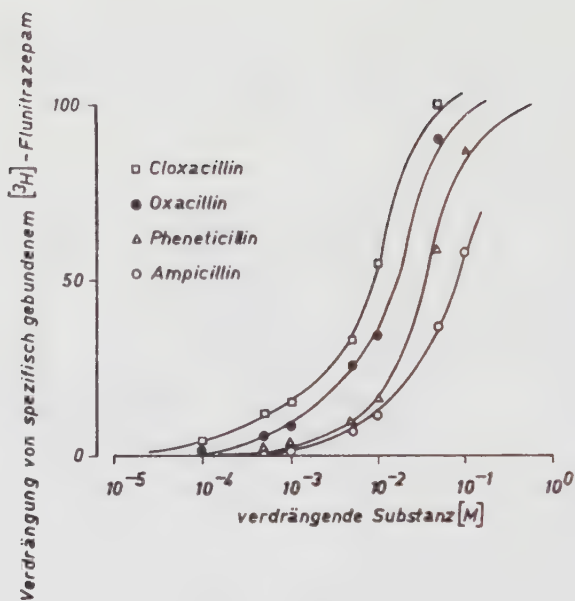


Abb. 7: Verdrängung spezifischer $[^3\text{H}]$ Flunitrazepambindung durch verschiedene Penicillinderivate. Die Punkte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen eines charakteristischen Einzelexperimentes dar.

3.2. Beteiligung von Benzodiazepinrezeptorinteraktionen an der Neurotoxizität verschiedener Penicillinderivate

Penicillin-induzierte Neurotoxizität ist der limitierende Faktor für eine hochdosierte Penicillintherapie (Raichle et al., 1971; Weihs et al., 1975; Watanabe et al., 1978). Eine wichtige Eigenschaft vieler halbsynthetischer Penicillinderivate ist deren Neurotoxizität. Die zur Auslösung von Konvulsionen erforderlichen Dosierungen in vivo differieren bei den untersuchten Penicillinderivaten um mehr als eine Zehnerpotenz (Weihs et al., 1975; 1976). Diese Autoren fanden bei ihren Untersuchungen, daß für die Neurotoxizität eines Penicillins dessen Lipophilie eine ausschlaggebende Bedeutung besitzt, d.h., mit steigender Lipophilie nimmt die neurotoxische Wirkung zu. MacDonald und Barker (1978) diskutieren für die konvulsive Wirkung von Penicillin GABA-antagonistische Eigenschaften (s.o.). Da Benzodiazepin- und GABA-Rezeptor wahrscheinlich eine funktionelle Einheit bilden (Braestrup und Nielsen, 1980), wurden aus diesen Überlegungen heraus die Affinitäten verschiedener Penicillinderivate zum Benzodiazepinrezeptor mit ihrer neurotoxischen Wirkung verglichen.

Die Konzentrationen der untersuchten Penicillinderivate, die zur Inhibition spezifischer [^3H]GABA- oder [^3H]Flunitrazepambindung benötigt wurden waren relativ hoch (Tab. 8). Sie korrelieren aber gut mit dem Konzentrationsbereich, in dem ihre konvulsive oder GABA-antagonistische Eigenschaft in vivo gezeigt werden konnte (Gutnick et al., 1976; MacDonald et al., 1978).

Hydrophobe Interaktionen spielen in der Bindung von Penicillinderivaten am Benzodiazepinrezeptor möglicherweise eine entscheidende Rolle. Dafür spricht die recht gute Korrelation zwischen ihrer Affinität zum Rezeptor - ausgedrückt durch den IC_{50} -Wert - und ihrer Lipophilie - ausgedrückt durch ihren Verteilungskoeffizienten zwischen n-Octanol und Phosphatpuffer pH 7,4 (Tab. 9).

Andererseits ist die Verdrängung des spezifisch gebundenen [^3H]Flunitrazepam nicht nur das Ergebnis einer unspezifischen hydrophoben Wechselwirkung mit cerebralen Membranen, denn im Rattenhirnhomogenat hatten Penicillinkonzentrationen bis zu 5 mM keinen Effekt auf die spezifische [^3H]QNB-Bindung am muscarinischen Acetylcholinrezeptor (Tab. 5). Der Zusammenhang zwischen der Affinität zum Benzodiazepinrezeptor, charakterisiert durch den IC_{50} -Wert, und der neurotoxischen

Wirkung, charakterisiert durch den Neurotoxizitätsindex (Auftreten von Konvulsionen), ist in Abb. 8 dargestellt. Es zeigt sich, daß zwischen der Affinität der Penicilline zum Benzodiazepinrezeptor und ihrer neurotoxischen Wirkung eine gute Korrelation besteht. Mit zunehmendem IC_{50} -Wert, d.h. mit abnehmender Affinität zum Rezeptor, nimmt auch die neurotoxische Wirkung ab. Dies steht im Einklang mit der Annahme, daß möglicherweise antagonistische Eigenschaften am Benzodiazepinrezeptor am Wirkungsmechanismus dieser Pharmaka beteiligt sind, der für die konvulsiven Eigenschaften von Penicillinen verantwortlich ist, in ähnlicher Weise wie dies für das Analeptikum Pentylenetetrazol vermutet wurde (Müller et al., 1978). Die Penicillinderivate mit geringerer Neurotoxizität (Carbenicillin, Benzylpenicillin und Tricarcillin) liegen in Abb. 8 auf dem flach verlaufenden Schenkel der hyperbolischen Kurve. Auf die mögliche Bedeutung des hyperbolischen Kurvenverlaufs im doppelt-logarithmischen System wird in der Diskussion eingegangen.

Tab. 9: Benzodiazepinrezeptoraffinität, Neurotoxizität und Lipophilie verschiedener Penicillinderivate

Penicilline	IC ₅₀ -Werte [³ H]Flunitra- zepam	Neurotoxi- zitätsindex	Verteilungs- koeffizient
Dicloxacillin	5,0	337	4,1
Cloxacillin	5,3	78	1,8
Oxacillin	15,8	33	1,3
Pheneticillin	26,0	45	1,4
Benzylpenicillin	41,0	15	0,5
Ticarcillin	41,0	11	0,1
Carbenicillin	330,0	11	0,05

Die Tab. zeigt eine Gegenüberstellung von IC₅₀-Werten verschiedener Penicillinderivate am Benzodiazepinrezeptor im Rattenhirn mit den entsprechenden Neurotoxizitätsindices, erhoben am Kaninchen in vivo und den Verteilungskoeffizienten zwischen n-Octanol und Puffer. Die Neurotoxizitätsindices und die Verteilungskoeffizienten wurden von Weihrauch et al. (1975; 1976) übernommen.

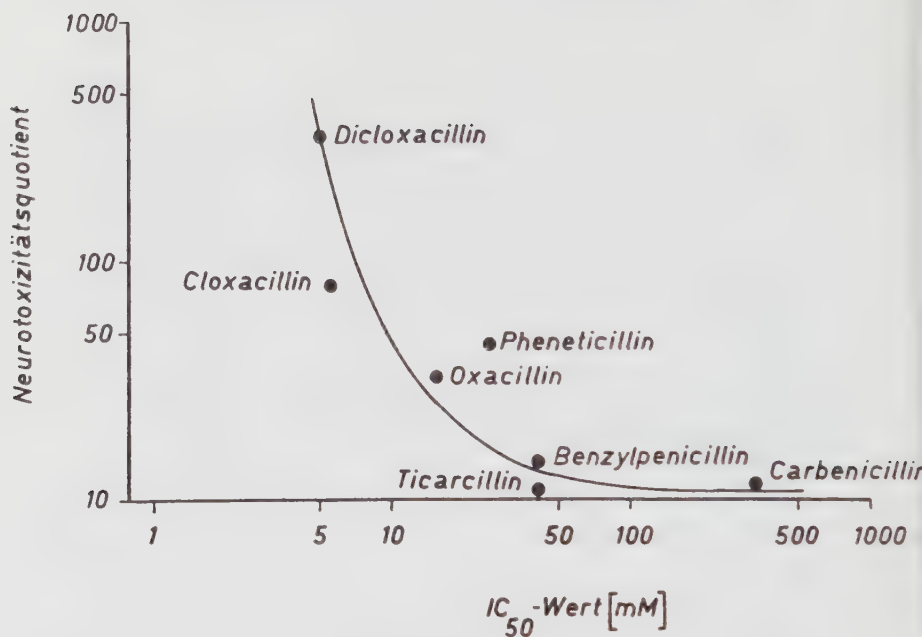


Abb. 8: Korrelation zwischen der Affinität der Penicillinderivate zum Benzodiazepinrezeptor und ihrer Neurotoxizität. Die Affinität ist charakterisiert durch die IC_{50} -Werte, die Neurotoxizität der Penicilline durch den Neurotoxizitätsquotienten T ($T = 1/t \times D$; $t \hat{=}$ Anzahl der Minuten bis zum Auftreten erster Spikewave-Paroxysmen; $D \hat{=}$ Penicillindosis beim Zeitpunkt t in mM/kg). Die Neurotoxizitätsquotienten sind Literaturwerte nach Weihrauch et al. (1976).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, inwieweit die bekannten zentralen Wirkungen bestimmter Pharmaka möglicherweise über den Benzodiazepinrezeptor entfaltet werden. Die verwendeten Substanzen (Tab. 2) zeigten mit Ausnahme von Methaqualon, Glutethimid und Fominoben eine sehr geringe Affinität zum Benzodiazepinrezeptor, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die pharmakologischen Wirkungen dieser Substanzen nicht über diesen Rezeptor vermittelt werden.

Für Methaqualon, Glutethimid und Fominoben erhebt sich jedoch die Frage, inwieweit pharmakologische Wirkungen dieser Pharmaka über eine Interaktion mit dem Benzodiazepinrezeptor zu erklären sind. Einen ersten Hinweis in dieser Richtung geben die vergleichsweise hohen Affinitäten dieser Substanzen zum Benzodiazepinrezeptor (s. Tab. 3).

Eine mögliche Korrelation zwischen anxiolytischen und antikonvulsiven Effekten von Methaqualon und seiner Affinität zum Benzodiazepinrezeptor wurde schon von Müller et al. (1978) diskutiert. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die vergleichsweise hohe Affinität dieser Substanz zum Benzodiazepinrezeptor gezeigt werden. Damit bietet sich die Möglichkeit an, daß die von Brown und Goenechea (1973) für Methaqualon beschriebenen anxiolytischen und antikonvulsiven Nebenwirkungen durch eine Interaktion mit dem Benzodiazepinrezeptor zu erklären sind.

Über das pharmakologische Wirkungsspektrum von Glutethimid besteht heute noch weitgehend Unklarheit. Seine Wirkung ähnelt in mancher Beziehung der der Barbiturate. Es besitzt antikonvulsive Wirkungen und ähnelt auch bezüglich der EEG-Beeinflussung und der Unterdrückung des REM-Schlafes den Barbituraten. Andererseits zeigen sich aber auch deutliche Unterschiede zu den Barbituraten; so verändern Dosen, die den REM-Schlaf beeinflussen, nicht den Aufwachrhythmus pro Nacht oder die Gesamtschlafzeit. Außerdem besitzt Glutethimid anticholinerge Wirkungen (Goodman und Gilman, 1980). Die Affinität von Glutethimid zum Benzodiazepinrezeptor ist, wie die vorliegenden Untersuchungen zeigten, etwa hundertfach geringer als die Affinität von Chlordiazepoxid und mehr als zehnfach geringer als die von Medazepam, des schwächsten therapeutisch verwendeten Benzodiazepinderivates. Die mittlere hypnotische Dosierung (300 - 500 mg) liegt etwa zehnmal höher als die des Chlordiazepoxid oder des Medazepam. Wegen der oben erwähnten anticho-

linergen Wirkung, die möglicherweise über eine direkte Interaktion dieses Pharmakons mit dem muscarinischen Acetylcholinrezeptor zu erklären ist, wurde dessen Affinität zu diesem Rezeptor ebenfalls untersucht. Der gefundene IC_{50} -Wert (Abb. 5) liegt mit $180 \mu M$ weitaus höher als am Benzodiazepinrezeptor (IC_{50} : $42 \mu M$), so daß es möglich ist, daß die anticholinergen Effekte auf direkte atropinartige Wirkungen zurückgehen. Andererseits können die zentralen Wirkungen (s.o.) des Glutethimid nicht über eine Bindung am Acetylcholinrezeptor erklärt werden. Hier läßt die hohe Affinität der Substanz zum Benzodiazepinrezeptor vermuten, daß einige Aspekte des Wirkungsspektrums von Glutethimid über diesen Rezeptor vermittelt werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch noch keine abschließende Aussage über diese Problematik zu. Es erscheint jedoch sinnvoll, bei weiterführenden Untersuchungen den Wirkungsmechanismus des Glutethimid unter diesem Aspekt zu sehen.

Als weitere Substanz mit einer hohen Affinität zum Benzodiazepinrezeptor erwies sich Fominoben. Fominoben, ein Atemstimulanz mit antitussiven Eigenschaften (Püschmann und Engelhorn, 1973), zeigt die höchste Affinität aller untersuchten Nicht-Benzodiazepinderivate zum Benzodiazepinrezeptor. Der IC_{50} -Wert ist nur geringfügig niedriger als der für Chlordiazepoxid (Damm et al., 1978). Deshalb ist auch für dieses Pharmakon zu vermuten, daß in vivo eine Interaktion mit dem Benzodiazepinrezeptor stattfindet, die möglicherweise für bestimmte pharmakologische Wirkungen des Fominoben verantwortlich ist. Die mittlere therapeutische Dosis von 200 mg (Zimmer, 1973) ist mindestens zehnmal höher als die der Benzodiazepine. Damit erreicht Fominoben in therapeutischen Dosierungen Plasmaspiegel (Zimmer, 1973), die ausreichen, um eine halbmaximale Verdrängung zu bewirken. Von seinem pharmakologischen und toxikologischen Wirkungsspektrum her ist Fominoben eine mehr ZNS-stimulierende als dämpfende Eigenschaft zuzuschreiben (Püschmann und Engelhorn, 1973). Deshalb sind diesem Pharmakon letztlich wohl antagonistische Eigenschaften am Benzodiazepinrezeptor zuzuschreiben wie dies auch für Pentylenetetrazol diskutiert wurde (Müller et al., 1978; Marangos et al., 1979).

Eine weitere Substanzgruppe mit zentralen Effekten sind die Penicilline. Durch ihren weiten Anwendungsbereich als Antibiotika bei Infektionskrankheiten sind ihre zentralen Nebenwirkungen von besonderem Interesse. Unter hochdosierter Penicillintherapie (20 - 30 Mio. IE

Penicillin oder mehr) wurden neurotoxische Reaktionen bei verschiedenen Penicillinderivaten beobachtet (Bloomer et al., 1967; Conway et al., 1968; Kurtzman et al., 1970; Weihsrauch et al., 1974a; 1974b). Diese sogenannte Penicillinencephalopathie äußert sich in Parästhesien, Halluzinationen, Myoclonien und generalisierten Krampfanfällen von Grand-Mal-Typ. Sind diese Symptome einmal aufgetreten, so können sie trotz sofortigem Absetzen des Penicillins noch für mehrere Stunden andauern (New und Wells, 1965; Bloomer et al., 1967; Bormann und Eyal, 1968; Conway et al., 1968; Seamans et al., 1968; Whelton et al., 1971). Die Behandlung dieses neurotoxischen Zustandsbildes wurde recht unterschiedlich durchgeführt. In den meisten Fällen wurde die Penicillintherapie abgesetzt, und die Symptome verschwanden innerhalb einiger Stunden. In besonders schweren Fällen, z.B. beim Auftreten eines generalisierten Krampfanfalles, wurden zusätzlich Antikonvulsiva gegeben wie Diazepam, Phenytoin, Chloralhydrat, Phenobarbital und Paraldehyd (Bloomer et al., 1967; Bormann und Eyal, 1968; Conway et al., 1968; Seamans et al., 1968; Whelton et al., 1971; Weihsrauch et al., 1974a; 1974b; 1976).

Eine Reihe von Untersuchungen in den letzten Jahren ergaben Hinweise auf eine Unterdrückung GABAerger synaptischer Transmission durch Penicilline (Curtis et al., 1972; Davidoff, 1972; Hochner et al., 1976; MacDonald und Barker, 1977; 1978). Diese Eigenschaft der Penicilline wurde als Erklärung für die konvulsiven und epileptogenen Effekte hoher Dosierungen dieser Pharmaka verantwortlich gemacht (Curtis et al., 1972; Davidoff, 1972; Hochner et al., 1976). Weiterhin umstritten ist jedoch die Frage, inwieweit die GABA-antagonistischen Eigenschaften direkt über den GABA-Rezeptor vermittelt werden (Curtis et al., 1972; Davidoff, 1972; Hochner et al., 1976; MacDonald und Barker, 1977; 1978). Um vielleicht diese Frage zu klären, wurden in dieser Arbeit die Affinitäten verschiedener Penicillinderivate am GABA-Rezeptor und am Benzodiazepinrezeptor untersucht. Damit erhebt sich die Frage, warum in diesem Zusammenhang Untersuchungen am Benzodiazepinrezeptor von Interesse sind.

Nach einer von Braestrup und Nielsen (1980) vorgestellten Hypothese besteht zwischen beiden Rezeptoren eine Kopplung, die eine wechselseitige Beeinflussung zur Folge hat. Demnach wäre eine Inhibition GABAerger Übertragung auch über den Benzodiazepinrezeptor möglich. Aus diesem Grund erschien es interessant, die Affinitäten verschiede-

ner Penicillinderivate an beiden Rezeptoren zu untersuchen. Als Referenz diene in diesen Experimenten Pentylenetetrazol, dem aufgrund elektrophysiologischer Untersuchungen (MacDonald und Barker, 1977; 1978) GABA-antagonistische Eigenschaften zugeschrieben werden. Die Affinität des Pentylenetetrazol zum Benzodiazepinrezeptor ist jedoch um eine Zehnerpotenz höher als die zum GABA-Rezeptor. Deshalb wäre es denkbar, daß die GABA-antagonistischen Eigenschaften dieser Substanz über den Benzodiazepinrezeptor vermittelt werden (Müller et al., 1978). Da die Benzodiazepine funktionell die GABAerge Übertragung stimulieren sollen, wurde für Pentylenetetrazol eine Benzodiazepin-antagonistische Wirkung am Benzodiazepinrezeptor postuliert, die ihrerseits zu einer Hemmung der GABAergen Übertragung führen sollte (Müller et al., 1978).

Mit diesem theoretischen Ansatz ergaben die Affinitätsbestimmungen der Penicilline an beiden Rezeptoren einen überraschenden Befund. Wie Tab. 9 zeigt, bestehen keine wesentlichen Unterschiede in den IC_{50} -Werten der untersuchten Penicilline am Benzodiazepin- und GABA-Rezeptor. Weiterhin zeigen die Penicilline eine gewisse Spezifität zu diesen beiden Rezeptoren, denn im Konzentrationsbereich bis 5 mM läßt sich keine Wirkung auf die spezifische Ligandenbindung am muscarinischen Acetylcholinrezeptor zeigen (Yamamura und Snyder, 1974). Die Konzentrationen der Penicillinderivate, die eine halbmaximale Hemmung der spezifischen Ligandenbindung am Benzodiazepin- und GABA-Rezeptor zeigen, sind zwar relativ hoch, stimmen jedoch gut mit dem Konzentrationsbereich überein, in dem konvulsive oder GABA-antagonistische Eigenschaften in vivo gezeigt werden konnten (Gutnick et al., 1976; MacDonald und Barker, 1978).

Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß Penicilline schwache GABA-Rezeptorantagonisten sind. Darüberhinaus geben die Befunde am Benzodiazepinrezeptor Hinweise darauf, daß die GABAerge Übertragung nicht nur direkt am GABA-Rezeptor durch Penicilline beeinflusst wird, sondern auch eine Blockade des Benzodiazepinrezeptors für die konvulsiven und epileptogenen Effekte der Penicilline verantwortlich ist. Demnach müßte auch für die Penicilline ein ähnlicher Mechanismus angenommen werden, wie er für Pentylenetetrazol beschrieben wird (MacDonald und Barker, 1977; 1978).

Eine weitere Möglichkeit der Erklärung wäre eine getrennte Penicillinbindungsstelle, die über eine Beeinflussung einer Chloridionophore

eine Beeinflussung beider Rezeptoren vortäuscht (Braestrup und Nielsen, 1980). Eine weiterführende Klärung dieser Zusammenhänge bedarf weiterer Untersuchungen.

Ausgehend von der Annahme, daß jedoch die Wechselwirkung mit dem Benzodiazepinrezeptor eine der Hauptursachen für die neurotoxische Wirkung von Penicillinderivaten darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Affinität der Penicilline zum Benzodiazepinrezeptor mit ihrer Lipophilie und ihrer Neurotoxizität zu korrelieren. Die in Tab. 9 dargestellten Ergebnisse zeigen eine recht gute Korrelation zwischen diesen Parametern. Dicloxacillin zeigt z.B. die höchste Affinität zum Benzodiazepinrezeptor und ebenso die höchste Lipophilie und den höchsten Neurotoxizitätsindex. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Lipophilie von Penicillinderivaten anscheinend in engem Zusammenhang mit ihrer Affinität zum Benzodiazepinrezeptor steht und diese wiederum mit ihrer Neurotoxizität. Andererseits ergibt die Korrelation der Affinitäten zum Benzodiazepinrezeptor mit den entsprechenden Neurotoxizitätsindices (Weihrauch et al., 1975; 1976) im doppelt-logarithmischen System einen hyperbolischen Kurvenverlauf. Dieses Ergebnis zeigt, daß möglicherweise noch einige zusätzliche Faktoren die Neurotoxizität von Penicillinen beeinflussen. Denkbar wäre, daß neben der Affinität zum Benzodiazepin- und GABA-Rezeptor auch die Penetration in das ZNS gleichermaßen durch die Lipophilie beeinflusst wird.

Zusammengefaßt geben diese Ergebnisse einige Hinweise darauf, daß Penicilline ihre neurotoxische Wirkung über eine Wechselwirkung mit dem GABAergen synaptischen System entfalten. Neben einem Antagonismus am GABA-Rezeptor selbst sind auch antagonistische Eigenschaften am Benzodiazepinrezeptor vermutlich an den konvulsiven Eigenschaften der Penicilline beteiligt. Diese beiden Mechanismen potenzieren sich möglicherweise, so daß die Penicillinkonzentrationen, die zur Beeinflussung der GABAergen Übertragung notwendig sind, eventuell niedriger sind, als es aufgrund ihrer Affinität zu erwarten wäre. Außerdem deutet auch die Tatsache, daß Diazepam in der Verhinderung Penicillin-induzierter Konvulsionen sehr viel wirksamer ist als Phenytoin oder andere Antikonvulsiva (Weihrauch et al., 1976; Watanabe et al., 1978) auf eine direkte Beteiligung des Benzodiazepinrezeptors am Wirkungsmechanismus der Penicilline hin. Ein weiterer wesentlicher Faktor der

Penicillinneurotoxizität scheint die Lipophilie der Penicillinderivate zu sein, die ihre Penetration ins ZNS (Bluthirnschranke) und ihre Affinität zum GABA- und zum Benzodiazepinrezeptor beeinflußt.

5. Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung verschiedener ZNS-dämpfender oder stimulierender Pharmaka mit dem Benzodiazepinrezeptor untersucht. Aus der Vielzahl der untersuchten, das ZNS dämpfenden Pharmaka waren nur die Affinitäten von Methaqualon und Glutethimid zum Benzodiazepinrezeptor hoch genug, um benzodiazepinartige Effekte im pharmakologischen Wirkungsspektrum dieser Substanzen vermuten zu lassen. Bei den ZNS-stimulierenden Pharmaka konnte die hohe Affinität des Analeptikums Pentylentetrazol zum Benzodiazepinrezeptor bestätigt werden. Für das Atemstimulanz Fominoben wurde erstmals eine sehr hohe Affinität zum Benzodiazepinrezeptor gefunden.
2. Zur Aufklärung des Mechanismus der Neurotoxizität von Penicillinen wurde deren mögliche Wechselwirkung mit Benzodiazepin- und GABA-Rezeptoren untersucht. Für alle untersuchten Penicilline lag die halbmaximale Hemmkonzentration an beiden Rezeptoren im millimolaren Bereich. Diese Konzentrationen lassen sich gut mit Konzentrationen korrelieren, die zur Krampfauslösung in vivo benötigt werden.
3. Zwischen der Affinität der Penicilline am Benzodiazepinrezeptor und ihrem Neurotoxizitätsindex konnte eine gute Korrelation nachgewiesen werden. Die Affinität zum Benzodiazepinrezeptor scheint von der Lipophilie der einzelnen Verbindungen abzuhängen. Die Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß antagonistische Eigenschaften am GABA- und am Benzodiazepinrezeptor an der neurotoxischen Wirkung der Penicilline beteiligt sind. Beide Mechanismen und die Penetration in das ZNS scheinen durch die Lipophilie der Substanzen positiv beeinflußt zu werden.

6. Literature

- Bloomer, H.A., Barton, L.J. and Maddock, R.K.:
Penicillin-induced encephalopathy in uremic patients
J. Amer. med. Ass., **200**, 121-123 (1967)
- Borbe, H.O., Müller, W.E. and Wollert, U.:
The identification of benzodiazepine receptors with brain-like
specificity in bovine retina
Brain Res., **182**, 466-469 (1980)
- Bormann, J.B. and Eyal, Z.:
Neurotoxic effects of large doses of penicillin administered intra-
venously
Arch. Surg., **97**, 662-665 (1968)
- Braestrup, C. and Squires, R.F.:
Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by
high affinity [3 H]diazepam binding
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3805-3809 (1977)
- Braestrup, C. and Squires, R.F.:
Brain specific benzodiazepine receptors
Brit. J. Psychiat., **133**, 249-260 (1978a)
- Braestrup, C. and Squires, R.F.:
Pharmacological characterization of benzodiazepine receptors in
the brain
Europ. J. Pharmacol., **48**, 263-270 (1978b)
- Braestrup, C. and Nielsen, M.:
Benzodiazepine receptors
Arzneimittel-Forsch., **30**, 852-857 (1980)
- Brown, S.S. and Goenechea, S.:
Methaqualone: metabolic, kinetic, and clinical pharmacological ob-
servations
Clin. Pharmacol. Ther., **14**, 314-324 (1973)
- Conway, N., Beck, E. and Somerville, J.:
Penicillin encephalopathy
Postgrad. Med. J., **44**, 891-897 (1968)
- Costa, E. and Guidotti, A.:
Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., **19**, 531-545 (1979)
- Curtis, D.R., Came, C.J.A., Johnston, G.A.R., McCulloch, R.M. and Mac-
Lachlan, R.M.:
Convulsive action of penicillin
Brain Res., **43**, 242-245 (1972)
- Damm, H.W., Müller, W.E., Schläfer, U. and Wollert, U.:
[3 H]Flunitrazepam: Its advantages as a ligand for the identifica-
tion of benzodiazepine receptors in rat brain membranes
Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol., **22**, 597-600 (1978)

- Davidoff, R.A.:
Penicillin and inhibition in the cat spinal cord
Brain Res., **45**, 638-642 (1972)
- Enna, S.J. and Snyder, S.H.:
Properties of γ -aminobutyric acid (GABA) receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions
Brain Res., **100**, 81-97 (1975)
- Enna, S.J. and Snyder, S.H.:
Influences of ions, enzymes and detergents on γ -aminobutyric acid-receptor binding in synaptic membranes of rat brain
Molec. Pharmacol., **13**, 442-453 (1977)
- Goodman, L.S. and Gilman, A.:
The pharmacological basis of therapeutics
6th edition, pp. 364-365, Macmillan Publishing Co., New York, 1980
- Gutnick, M.J., Van Duijn, H. and Citri, N.:
Relative convulsant potencies of structural analogues of penicillin
Brain Res., **114**, 139-143 (1976)
- Haefely, W.E.:
Behavioral and neuropharmacological aspects of drugs used in anxiety and related states
In: "Psychopharmacology, a Generation of Progress", ed. by M.A. Lipton, A. DiMascio, and K.F. Killam, Raven Press, New York, 1978
- Hochner, B., Spira, M.E. and Werman, R.:
Penicillin decreases chloride conductance in crustacean muscle: a model for the epileptic neuron
Brain Res., **107**, 85-103 (1976)
- Horng, J.S. and Wong, D.T.:
 γ -Aminobutyric acid receptors in cerebellar membranes of rat brain after treatment with Triton X-100
J. Neurochem., **32**, 1379-1386 (1979)
- Kurtzman, N.A., Rogers, P.W. and Harter, H.R.:
Neurotoxic reaction to penicillin and carbenicillin
J. Amer. med. Ass., **214**, 1320-1321 (1970)
- Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.:
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951)
- MacDonald, R.L. and Barker, J.L.:
Pentylentetrazole and penicillin are selective antagonists of GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian neurones
Nature (Lond.), **267**, 720-721 (1977)
- MacDonald, R.L. and Barker, J.L.:
Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal neurones: a common mode of convulsant action
Neurology (Minneap.), **28**, 325-330 (1978)

- Marangos, P.J., Paul, S.M., Parma, A.M., Goodwin F.K., Syapin, P. and Skolnick, P.:
Purinergetic inhibition of diazepam binding to rat brain (in vitro)
Life Sci., **24**, 851-858 (1979)
- Möhler, H. and Okada, T.:
Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system
Science, **198**, 849-851 (1977)
- Möhler, H. and Okada, T.:
The benzodiazepine receptor in normal and pathological human brain
Brit. J. Psychiat., **133**, 261-268 (1978)
- Möhler, H., Okada, T., Heitz, P. and Ulrich, J.:
Biochemical identification of the site of action of benzodiazepines in human brain by [^3H]diazepam binding
Life Sci., **22**, 985-996 (1978)
- Müller, W.E., Schläfer, U. and Wollert, U.:
Benzodiazepine receptor binding: The interaction of some non-benzodiazepine drugs with specific [^3H]diazepam binding to rat brain synaptosomal membranes
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **305**, 23-26 (1978)
- Müller, W.E.:
Der Benzodiazepinrezeptor
Dtsch. med. Wschr., **105**, 69-71 (1980)
- Müller, W.E.:
The benzodiazepine receptor, an update
Pharmacology, **22**, 153-161 (1981)
- New, P.S. and Wells, C.E.:
Cerebral toxicity associated with massive intravenous penicillin therapy
Neurology, **15**, 1053-1058 (1965)
- Olsen, R.W., Ticku, M.K., van Ness, P.C. and Greenlee, D.:
Effects of drugs on γ -aminobutyric acid receptors, uptake, release, and synthesis in vitro
Brain Res., **139**, 277-294 (1978)
- Püschmann, S. and Engelhorn, R.:
Pharmakologische Untersuchungen über eine Substanz mit antitussiven und atmungsanregenden Eigenschaften
Arzneimittel Forsch., **23**, 296-305 (1973)
- Raichle, M.E., Kutt, H., Luis, S. and McDowell F.:
Neurotoxicity of intravenously administered penicillin
G. Arch. Neurol., **25**, 232-239 (1971)
- Scatchard, G.:
The attraction of proteins for small molecules and ions
Ann. N.Y. Acad. Sci. USA, **51**, 660-672 (1949)

- Seamans, K.B., Gloor, P., Dobell, A.R.C. and Wyant, J.D.:
Penicillin induced seizures during cardiopulmonary bypass
N. Engl. J. Med., **278**, 861-868 (1968)
- Speth, R.C., Wastek, G.J., Johnson, P.C. and Yamamura, H.I.:
Benzodiazepine binding in human brain. Characterization using [^3H]-
flunitrazepam
Life Sci., **22**, 859-866 (1978)
- Tallman, J.F., Paul, S.M., Skolnick, P. and Gallager, D.W.:
Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines
Science, **207**, 274-281 (1980)
- Watanabe, H., Watanabe, K., Goto, Y. and Yamaguchi, M.:
Effects of anticonvulsive drugs on convulsions induced by penicillin injected intracerebroventricularly in mice
Yakugaku Zasshi, **98**, 653-659 (1978)
- Wehrauch, T.R., Prior, H.J., Höffler, D. and Krieglstein, J.:
Über die Neurotoxizität von Carbenicillin
Klin Wschr., **52**, 842-846 (1974b)
- Wehrauch, T.R., Schmidt, W., Höffler, D. and Krieglstein, J.:
The neurotoxic effect of benzylpenicillin and ampicillin studied in the rabbit
Arzneimittel Forsch., **24**, 317-321 (1974a)
- Wehrauch, T.R., Köhler, H., Höffler, D. and Krieglstein, J.:
Cerebral toxicity of penicillins in relation to their hydrophobic character
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **289**, 55-64 (1975)
- Wehrauch, T.R., Köhler, H., Höffler, D., Rieger, H. and Krieglstein, J.:
Neurotoxicity of different penicillins and the effect of diazepam and phenytoin on penicillin-induced convulsions
In: J.D. Williams, A.D. Geddes (eds.), Chemotherapy, Vol. 4, Plenum Press, New York, 1976
- Whelton, A., Carter, G., Garth, M., Darwish, M.O. and Walker W.G.:
Carbenicillin-induced acidosis and seizures
J. Amer. med. Ass., **218**, 1942-1943 (1971)
- Wilson, W.A. and Escueta, A.V.:
Common synaptic effects of pentylenetetrazole and penicillin
Brain Res., **72**, 168-171 (1974)
- Yamamura, H.I. and Snyder, S.H.:
Muscarinic cholinergic binding in rat brain
Proc. Nat. Acad. Sci., **71**, 1725-1729 (1974)
- Zimmer, A.:
Pharmakokinetik und Metabolismus von Noleptan^R beim Menschen
Arzneimittel Forsch., **23**, 1798-1801 (1973)

7. Lebenslauf

Geboren:	04.02.1951 in Pentalofos Griechenland
Eltern:	Angelika Antoniadis, geb. Feizi Polychronis Antoniadis
1957 - 1963	Grundschule Pentalofos
1963 - 1969	Gymnasium in Orestias
01.07.1969	Reifeprüfung
1970 - 1974	Naturwissenschaftliches Studium (Chemie, Physik, Mathematik, Biochemie) an der Eberhard Karls Uni- versität Tübingen
25.10.1973	Diplom-Vorprüfung in Chemie
22.03.1974	Beginn des Medizinstudiums an der Johannes Guten- berg-Universität Mainz
27.08.1976	Ärztliche Vorprüfung
26.08.1977	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21.08.1979	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
15.10.1979 - 14.10.1980	Praktisches Ausbildungsjahr am Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Chirurgie, Innere Medizin, Orthopädie)
27.10.1980	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit Juli 1978	Dissertation am Pharmakologischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz im Arbeits- kreis von Herrn Prof. Dr. U. Wollert und Herrn Priv.-Doz. Dr. W.E. Müller
seit 15.01.1981	Assistenzarzt auf der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Balingen

